

Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе

Е. И. Рябова, А. А. Деркаев, И. Б. Есмагамбетов*, Д. В. Щербляков, М. А. Довгий, Д. В. Бырихина, В. В. Прокофьев, И. П. Чемоданова

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

Векторы на основе аденоассоциированного вируса являются одними из наиболее перспективных для доставки трансгенов в различные органы и ткани. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV) способен трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, обладает низкой иммуногенностью и способен обеспечивать долгосрочную экспрессию трансгенов. На сегодняшний день существуют технологии, позволяющие получать rAAV для применения *in vivo*, однако они не лишены недостатков, связанных с трудоемкостью, сложностями масштабирования и высокой стоимостью, поэтому вопрос об усовершенствовании технологических схем получения rAAV является актуальным. **Цель работы:** сравнение технологических подходов к получению rAAV, основанных на различных условиях культивирования трансфицированной клеточной линии HEK293 в лабораторном масштабе. **Материалы и методы:** в исследовании использовали культуру клеток HEK293, плазмидную систему AAV-DJ Packaging System, систему PlasmidSelect Xtra Starter Kit. В качестве модели для сравнения технологий использовали вектор rAAV с трансгеном однодоменного антитела, слитого с Fc-фрагментом IgG1, специфичного к ботулотоксину. Применяли метод трансфекции клеток HEK293 суперскрученной плазмидной ДНК, выделенной при помощи трехступенчатой хроматографической очистки. Определение подлинности препарата rAAV проводили методами электрофореза, иммуноблоттинга и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. **Результаты:** продемонстрирована эффективность получения суперскрученной формы плазмидной ДНК, применимой для эффективной трансфекции с целью получения rAAV. Проведено сравнение процесса транзientной трансфекции и культивирования трансфицированных клеток HEK293 в условиях суспензии в колбах, адгезии в культуральных флаконах и адгезии в биореакторе BioBLU 5p на матрице из дисков Fibra-Cel с целью продукции rAAV. **Выводы:** показана возможность применения описанных подходов к очистке плазмидной ДНК, трансфекции и культивированию трансфицированных клеток в различных условиях для получения препарата rAAV, эспрессирующего ген антитела. Реактор BioBLU 5p с дисками Fibra-Cel был впервые использован для получения препаративных количеств rAAV в лабораторном масштабе, что позволило увеличить площадь поверхности адгезии при культивировании и трансфекции клеток и, как следствие, увеличить выход целевого продукта.

Ключевые слова: аденоассоциированный вирусный вектор; однодоменные антитела; трансфекция; аффинная хроматография; культура клеток HEK293; биореактор; суперскрученная форма плазмидной ДНК

Для цитирования: Рябова ЕИ, Деркаев АА, Есмагамбетов ИБ, Щербляков ДВ, Довгий МА, Бырихина ДВ, Прокофьев ВВ, Чемоданова ИП. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(4):266–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>

***Контактное лицо:** Есмагамбетов Ильяс Булатович; esmagambetovib@gmail.com

Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale

E. I. Ryabova, A. A. Derkaev, I. B. Esmagambetov*, D. V. Shcheblyakov, M. A. Dovgij, D. V. Byrikhina, V. V. Prokofiev, I. P. Chemodanova

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya,
18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

Adeno-associated virus vectors are among the most promising ones for the delivery of transgenes to various organs and tissues. Recombinant adeno-associated virus (rAAV) is able to transduce both dividing and non-dividing cells, has low immunogenicity, and is able to provide long-term expression of transgenes. Modern technologies make it possible to obtain rAAV for *in vivo* use, but they are not without drawbacks associated with laboriousness, scalability difficulties, and high cost, therefore, improvement of technological schemes for obtaining rAAV is an urgent issue. **The aim of the study** was to compare different technological approaches to rAAV production based on different conditions of the transfected HEK293 cell line cultivation on a laboratory scale. **Materials and methods:** HEK293 cell culture, AAV-DJ Packaging System, PlasmidSelect Xtra Starter Kit were used in the study. The technologies were compared using a model rAAV vector with a single-domain antibody transgene fused to the Fc-fragment of IgG1 specific to botulinum toxin. HEK293 cells were transfected with supercoiled plasmid DNA isolated by three-step chromatographic purification. The identity of the rAAV preparation was determined by electrophoresis, immunoblotting, and real-time polymerase chain reaction. **Results:** the study demonstrated the efficiency of the chromatographic method for obtaining a supercoiled form of plasmid DNA that can be used for efficient transfection of cell culture in order to produce rAAV. The study compared the following processes of rAAV production: using transient transfection and cultivation of the transfected HEK293 cell suspension in Erlenmeyer flasks,

adherent culture in T-flasks, and adherent culture in a BioBLU 5p bioreactor on a matrix of Fibra-Cel disks. **Conclusions:** the data obtained showed the possibility of using the described approaches to purification of plasmid DNA, cell transfection, and cultivation of the transfected cells under various conditions to obtain rAAV samples that expresses the antibody gene. The BioBLU 5p reactor with Fibra-Cel discs was used for the first time to produce preparative quantities of rAAV on a laboratory scale, which increased the adherent surface area during cell culture and transfection, and, as a result, increased the yield of the target product.

Key words: adeno-associated viral vector; single domain antibodies; transfection; affinity chromatography; HEK293 cell culture; bioreactor; supercoiled form of plasmid DNA

For citation: Ryabova EI, Derkaev AA, Esmagambetov IB, Shcheblyakov DV, Dovgiy MA, Byrikhina DV, Prokofiev VV, Chemodanova IP. Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2021;21(4):266–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>

***Corresponding author:** Ilias B. Esmagambetov; esmagambetovib@gmail.com

Аденоассоциированный вирус (AAV) принадлежит к роду *Dependoviriviridae* семейства вирусов *Parvoviridae*. Геном содержит одноцепочечную ДНК размером ~4,8 т.п.н. [1]. Особенностью AAV является зависимость его репликации от наличия в клетках аденовируса или вируса герпеса благодаря изменению характеристики клеточной среды в результате коинфекции. Геном AAV содержит гены *rep*, *cap* и *aap*: ген *rep* кодирует белки, необходимые для репликации и упаковки вирусного генома, ген *cap* — вирусные капсидные белки (VP1, VP2, VP3), образующие внешнюю оболочку капсида, защищающую вирусный геном [2]. Ген *aap* кодирует белок (AAP), активирующий сборку.

Для создания терапевтических препаратов используются рекомбинантные AAV (rAAV), в которых гены *rep* и *cap* заменены кассетой экспрессии трансгена. В отсутствие Rep белков кодируемые в rAAV трансгены могут образовывать кольцевые конкатемеры, которые сохраняются в виде эписом в ядре трансдуцированных клеток [3].

Одним из преимуществ использования rAAV является его низкая иммуногенность в сравнении с лентивирусными и аденовирусными векторами доставки. Причина этого до конца не изучена, однако предполагается, что AAV неэффективны в отношении активации антигенпрезентирующих клеток [4]. Благодаря этому векторы на основе AAV широко используются для создания терапевтических препаратов, требующих длительной экспрессии. Кроме того, AAV свободны от ряда недостатков других векторных систем. Известно, что лентивирусные векторы неспецифически интегрируются в геном клетки-хозяина, а аденовирусные — имеют высокий воспалительный потенциал, что вызывает сложности при их клиническом применении в качестве генотерапии [5].

При всех представленных преимуществах rAAV обладают и недостатками, такими как малая емкость генома, высокие трудозатраты и себестоимость при его получении [5]. Кроме того, на продукцию rAAV влияют многие факторы, включая клеточную линию, систему экспрессии, продолжительность культивирования трансфицированных клеток, общие условия культивирования и качество плазмидной ДНК [6].

Исходя из этого, для получения препаратов на основе rAAV необходимо наличие отработанной и масштабируемой технологии. Наибольшее практическое применение нашли методы, основанные на временном (транзистентном) трансфицировании клеток, поскольку они обеспечивают больший выход продукта [7], а также позволяют получить безопасный и эффективный препарат rAAV, экспрессирующий трансген [8]. Данный метод включает трансфекцию клеток HEK293 двумя или тремя плазмидами: первая кодирует целевой ген, вторая несет гены *rep*

и *cap* AAV, третья содержит гены-помощники адено- или герпесвирусов.

Помимо этого, препараты rAAV на основе транзистентной трансфекции апробированы для клинического применения, и сегодня существует несколько препаратов, находящихся на разных стадиях клинических исследований, из которых были зарегистрированы Glybera¹, Luxturna² и Zolgensma³ [9]. Однако позже препарат Glybera был снят с производства по причине высокой стоимости технологии. Таким образом, оптимизация и сравнение различных технологий получения rAAV является актуальной задачей.

В данной работе в качестве модели для сравнения технологий получения rAAV выбран rAAV, экспрессирующий однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1, специфичное к ботулиническому нейротоксину, полученное как описано S.A. Godakova с соавт. [10]. Нами впервые применен подход трехступенчатой очистки суперскрученной плазмидной ДНК (плазмидной scДНК), используемой для эффективной транзистентной трансфекции клеток HEK293 с целью получения rAAV. Кроме того, было проведено сравнение трех подходов культивирования транзистентно трансфицированных клеток HEK293: в условиях адгезии клеток — в культуральных флаконах и в биореакторе BioBLU, а также в виде суспензии в колбах. После тангенциальной фильтрации и хроматографической очистки препарата rAAV проводили его качественную и количественную характеристику.

Цель работы — сравнение технологических подходов к получению rAAV, основанных на различных условиях культивирования трансфицированной клеточной линии HEK293 в лабораторном масштабе. В ходе работы были поставлены следующие задачи: получение плазмидных scДНК в препаративных количествах; проведение транзистентной трансфекции клеток HEK293 в различных условиях с целью продукции rAAV, экспрессирующего антитело; получение очищенного препарата rAAV; характеристика чистоты, подлинности и трансдуцирующей активности полученного препарата rAAV.

Материалы и методы

Материалы

Культура клеток почки эмбриона человека HEK293 (получена из коллекции клеточных культур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), компетентные бактерии *E. coli* (DH5α, Invitrogen, США), плазмидная система AAV-DJ Packaging System (Cell Biolabs Inc, США), бактериальная среда (2YT Sigma-Aldrich, США), среда для культивирования HEK293 CDM4HEK293 (Cytiva Life Sciences, HyClone, Швеция), среда для трансфекций Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco,

¹ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera>

² <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/luxturna>

³ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zolgensma>

Thermo Fisher Scientific, США), среда DMEM (Gibco, США), среда BalanCD (Irvine Scientific, США), сорбент AVB Sepharose (Cytiva Life Sciences, Швеция), 2-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США), Твин-20 (Sigma-Aldrich, США), поликлональные кроличьи антитела к AAV (adeno-associated virus 2/AAV2 (VP1 + VP2 + VP3) rabbit polyclonal antibody, OriGene, США), HRP-конъюгированные антикроличьи антитела (HRP-conjugated anti-rabbit IgG, Sigma-Aldrich, США), антитела к IgG человека (Fc-специфические) (anti-human IgG, Fc-specific, peroxidase goat antibody, Sigma-Aldrich, США), система ECL Substrate (BioRad, США), краситель для образцов (4x Laemmli Sample Buffer, BioRad, США), обезжиренное молоко (Sigma-Aldrich, США); остальные реактивы, использованные для приготовления буферов, производства Sigma-Aldrich, США.

Оборудование

Автоматический счетчик клеток TC20 Cell Counter (BioRad, США), установка тангенциальной фильтрации AKTA flux S (Cytiva Life Sciences, Швеция), хроматографическая система AKTA Pure 25 (Cytiva Life Sciences, Швеция), спектрофотометр NanoDrop 2000C (Thermo Fisher Scientific, США), шейкер-инкубатор Multitron (Infors HT, Швейцария), биореактор BioFlo 320 (Eppendorf, Германия), инвертированный флуоресцентный микроскоп CX41 (Olympus).

Методы

Получение плазмидных конструкций. Для получения rAAV использовали плазмидную систему AAV-DJ Packaging System, состоящую из плазмид rAAV-DJ Vector, рHelper Vector и rAAV-GFP Control Vector. Плаزمида rAAV-DJ Vector несет в себе гены *g_{ер}*, необходимые для репликации, и *с_{ар}*, кодирующие белки капсида. Плазмида рHelper Vector содержит большую часть аденовирусного генома, необходимого для сборки инфекционных rAAV (гены белков E2A, E4 и вирус-ассоциированная РНК).

Рекомбинантное одномономерное антитело, слитое с Fc-фрагментом, специфичное к ботулиническому нейротоксину, было получено, как описано S.A. Godakova с соавт. [10]. Нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело, синтезировали в ЗАО «Евроген» (Россия) и клонировали в плазмиду rAAV-EGFP Control Vector, заменяя ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP) по сайтам рестрикции EcoRI и XbaI и получая таким образом плазмиду rAAV-B11-Fc.

Получение плазмидных scДНК в препаративных количествах. Для получения плазмидных scДНК проводили трансформацию компетентных бактерий *E. coli* целевыми плазмидами методом теплового шока [11], отбор клонов-трансформантов на селективной питательной среде (агаризованная среда 2YT с добавлением ампициллина 50 мкг/мл) и культивирование отобранного клона на жидкой среде 2YT в течение 16 ч при 37 °С при скорости перемешивания 210 об/мин в объеме 1 л для каждой плазмиды.

Бактерии лизировали согласно стандартной методике Бирнбойма и Доли [12]. Клетки из бактериальной культуры осаждали центрифугированием (20 мин, 4500 g) при температуре 4 °С. Осажденную бактериальную культуру ресуспендировали в 100 мл буфера (25 мМ трис-НСI, 10 мМ ЭДТА, 50 мМ глюкозы, рН 7,5) в соотношении 10 мл буфера на 1 г осадка. К суспензии добавляли 100 мл лизирующего буфера, аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин (200 мМ NaOH, 1% SDS). Далее проводили нейтрализацию лизирующего буфера путем добавления ацетатного буфера (3 М ацетат калия, рН 5,5), аккуратно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин. Далее лизат центрифугировали при 10000 g 20 мин и концентрировали в 10 раз при помощи

тангенциальной фильтрации на установке AKTA flux S и картриджа Hollow Fiber Cartridge, 300 kDa (Cytiva Life Sciences, Швеция). Дальнейшее выделение scДНК проводили на приборе AKTA Pure 25 с использованием системы Capto PlasmidSelect Xtra Starter Kit (Cytiva Life Sciences, Швеция), состоящей из трех последовательных стадий хроматографической очистки: гель-фильтрация на сорбенте Sepharose 6 FF, аффинная хроматография на сорбенте Capto PlasmidSelect Xtra и анионообменная хроматография на сорбенте Source 30Q. Все стадии хроматографической очистки проводили согласно инструкции фирмы-производителя. После этого плазмидную scДНК переосаждали добавлением 1/10 объема 3 М ацетата натрия и 2 объемам этанола, затем растворы замораживали (1 ч, –80 °С) и центрифугировали (0,5 ч, 12000 g). Осажденную scДНК растворяли в 200 мкл стерильной очищенной деионизированной воды. Количественное измерение ДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000C при длине волны 260 нм.

Электрофорез в агарозном геле. Образцы плазмидной scДНК анализировали методом горизонтального электрофореза в ТАЕ буфере (40 мМ Трис-НСI, 20 мМ уксусная кислота и 1 мМ ЭДТА, рН 8,0) в 0,8% агарозном геле с бромидом этидия (0,5 мкг/мл) в качестве окрашивающего вещества при напряжении 120 В.

Культивирование клеток. Адгезионную культуру клеток HEK293 культивировали в среде DMEM с добавлением 5 мМ L-глутамин, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), используя культуральные флаконы площадью 175 см² (Corning, США) при 37 °С, 80% влажности и 5% CO₂. Суспензионную культуру клеток HEK293 получали путем адаптации клеток к среде CDM4HEK293 с добавлением 2,0 г/л бикарбоната натрия, 5 мМ L-глутамин, ежедневно заменяя 30% среды на CDM4HEK в течение 7 суток. Далее клетки перемещали в колбы Эрленмейера с вентилируемой крышкой объемом 1000 мл (Corning, США), и культивировали с помощью шейкер-инкубатора Multitron со скоростью перемешивания 110–130 об/мин при амплитуде 50 мм. Культивирование проводили при 37 °С, 80% влажности и 5% CO₂.

Трансфекция клеток HEK293. Для трансфекции клеток HEK293 использовали полученные плазмидные scДНК rAAV-DJ Vector, rAAV-DJ-Helper и rAAV-B11-Fc в соотношении 1:1:1. В качестве положительного контроля использовали плазмиду rAAV-DJ EGFP, применяя ее вместо rAAV-B11-Fc, в отдельной колбе/флаконе с аналогичным объемом и концентрацией клеток. Для оценки качества трансфекции клеток при культивировании на дисках Fiba-Cel использовали отдельную 150 см² культуральную чашку, содержащую 0,75 г простерилизованных дисков Fiba-Cel и инокулированную клетками (0,5×10⁶ клеток в 12,5 мл среды DMEM). Общая концентрация плазмидной scДНК, используемой для трансфекции, составляла 1 мкг/мл культуральной жидкости. В качестве среды для приготовления трансфекционной смеси использовали Opti-MEM I Reduced Serum Medium в объеме 10% от конечного объема среды. Трансфекцию проводили с использованием раствора трансфицирующего агента полиэтиленимин (PEI) в концентрации 1 мг/мл. Объем PEI брали исходя из количества плазмидной scДНК в соотношении 1:4. Время инкубации агента с scДНК составляло 7 мин.

Продукция rAAV в суспензионных условиях культивирования клеток HEK293. За 7 суток до трансфекции клетки адаптировали к среде BalanCD HEK293 в колбах Эрленмейера объемом 1000 мл. За 2 ч до трансфекции клеток в суспензионных условиях проводили полную замену среды на свежую и рассеивали клетки до концентрации 1×10⁶/мл в объеме 1 л;

трансфицировали, как описано в подразделе «Трансфекция клеток HEK293». Эффективность трансфекции оценивали по уровню экспрессии репортерного гена белка EGFP. Через 48 ч в среду добавляли 4 г/л раствора глюкозы. pH среды регулировали путем добавления 7,5% раствора бикарбоната натрия. Через 72 ч проводили сбор rAAV путем осаждения клеток при 200 g в течение 10 мин и дальнейшего их лизиса путем ресуспендирования осадка в буфере объемом 100 мл (1% твин-20, 20 мМ трис-HCl, 50 мМ хлорида натрия, 2 мМ хлорида магния, бензонуклеаза 20 У/мл) и инкубации в течение 4 ч при периодическом перемешивании.

Производство rAAV в адгезионных условиях культивирования клеток HEK293. За сутки до трансфекции клетки, культивировавшиеся в условиях адгезии, пересевали в 30 культуральных флаконов 175 см² (Corning, США) в объеме 35 мл в концентрации 16×10^6 /флакон (~70% конфлюэнтности) с использованием питательной среды DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 4 мМ L-глутамин, 4,5 г/л глюкозы и 3,7 г/л бикарбоната натрия. Клетки во флаконах культивировали при 37 °C, 80% влажности и 5% CO₂. За 2 ч до трансфекции проводили полную замену среды на свежую; трансфицировали, как описано в подразделе «Трансфекция клеток HEK293». Через 24 ч после трансфекции проводили замену 30% среды на свежую для снижения эффекта токсичности трансфицирующего агента. Эффективность трансфекции оценивали по уровню экспрессии репортерного гена белка EGFP. Через 48 ч в среду добавляли 4 г/л раствора глюкозы. pH среды регулировали путем добавления 7,5% раствора бикарбоната натрия. Через 72 ч проводили сбор rAAV путем замены среды на буфер для лизиса в объеме 15 мл для каждого флакона (1% твин-20, 20 мМ трис-HCl, 50 мМ хлорида натрия, 2 мМ хлорида магния, бензонуклеаза 20 У/мл) и инкубировали 4 ч при периодическом перемешивании.

Производство rAAV в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 на дисках Fibracel. Для адгезионного культивирования клеток HEK293 использовали биореактор BioFlo 320 с одноразовым сосудом BioBLU 5p (Eppendorf, Германия) с рабочим объемом 2,5 л, наполненным дисками Fibracel (Eppendorf, Германия). Для культивирования использовали среду DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, 4 мМ L-глутамин, 4,5 г/л глюкозы и 3,7 г/л бикарбоната натрия. Концентрация клеточного инокулята составляла $0,5 \times 10^6$ /мл. Культивирование проводили при 37 °C, 5% CO₂; скорость перемешивания подбирали для достижения максимальной концентрации растворенного кислорода в пределах 30–80%. Через 24 ч после закрепления клеток на дисках Fibracel проводили трансфекцию, как описано в подразделе «Трансфекция клеток HEK293». Эффективность трансфекции оценивали путем отбора культуральной жидкости через 30 мин после проведения трансфекции и замены ей культуральную среду на посеянных заранее клетках в культуральном флаконе площадью 25 см² на среде DMEM. Через 48 ч культивирования в среду добавляли 4 г/л раствора глюкозы. pH среды регулировали подачей CO₂ и путем добавления 7,5% раствора бикарбоната натрия. Через 72 ч проводили сбор rAAV путем удаления среды из сосуда, заменяя ее на буфер для лизиса клеток в объеме 2,5 л (1% твин-20, 20 мМ трис-HCl, 50 мМ хлорида натрия, 2 мМ хлорида магния, бензонуклеаза 20 У/мл). Раствор оставляли на 4 ч при 37 °C при постоянном перемешивании.

Тангенциальная фильтрация и хроматографическая очистка rAAV. Полученные на предыдущих этапах растворы клеточных лизатов фильтровали с помощью стерилизующего картриджа Sartopore 2 0,45/0,22 мкм (Sartorius Stedim, Франция). Лизаты

концентрировали в 10 раз и диафильтровали 5 раз с использованием буфера 0,5 М NaCl, 0,02 М Трис-HCl, pH 7,5 с помощью системы тангенциальной фильтрации AKTA flux S (Cytiva Life Sciences, GE, Швеция) и картриджа Hollow Fiber Cartridge, 100 kDa (Cytiva Life Sciences, Швеция). Очистку rAAV из лизата проводили методом аффинной хроматографии с использованием хроматографической колонки XK16/20 (Cytiva Life Sciences, Швеция), упакованной 5 мл сорбента AVB Sepharose, согласно инструкции производителя. Уравновешивание и промывку колонки проводили связывающим буфером (20 мМ Трис-HCl, 500 мМ хлорид натрия, pH 8,0). Элюцию проводили в изократическом режиме буфером 0,1 М глицин-HCl, 500 мМ хлорид натрия, pH 2,5. Полученный препарат rAAV концентрировали с использованием центрифужных концентраторов 50 кДа Amicon Ultra-15 (Merck, США) и стерилизовали, используя мембранный фильтр 0,22 мкм (MF-Millipore, Merck, США).

Концентрацию вирусных частиц в препарате rAAV оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 при длине волны 260 нм. Соотношение пустых и полных капсидов в образцах определяли спектрофотометрически по отношению поглощения при длине волн 260 нм/280 нм.

Оценка чистоты препарата rAAV методом электрофореза. Чистоту препарата оценивали методом электрофореза в 4–20% полиакриламидном геле (4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 15-well, Bio-Rad, США) с использованием красителя для образцов 4x Laemmli Sample Buffer с добавлением 2-меркаптоэтанола для анализа в восстанавливающих условиях.

Оценка подлинности препарата rAAV методом иммуноблоттинга. Образцы препарата rAAV после очистки подвергали разделению в полиакриламидном геле (подраздел «Оценка чистоты препарата rAAV методом электрофореза») с последующим иммуноблоттингом. Перенос белков на мембрану (Amersham Protran Premium 0.45 µm NC, GE Healthcare Life science, Швеция) проводили с использованием прибора Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). Далее мембрану инкубировали в 5% растворе обезжиренного молока в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% Твин-20 (буфер ПБС-Т), для блокирования неспецифической сорбции. Затем в раствор добавляли первичные поликлональные кроличьи антитела к AAV (adeno-associated virus 2/AAV2 (VP1 + VP2 + VP3) rabbit polyclonal antibody в соотношении 1:1000 и инкубировали в течение 60 мин, после чего проводили трехкратную отмывку мембраны в ПБС-Т. Затем в свежий раствор ПБС-Т добавляли вторичные HRP-конъюгированные антикроличьи антитела (HRP-conjugated anti-rabbit IgG) в соотношении 1:2500 и инкубировали в течение 60 мин, после чего проводили пятикратную отмывку мембраны в ПБС-Т и визуализировали результаты, используя систему ECL Substrate и Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Швеция).

Оценка количества геномных копий в препаратах rAAV. Определение количества геномных копий rAAV в полученных после хроматографической очистки препаратах проводили с использованием метода полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) и флуоресцентного метода с помощью систем AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 и QuickTiter™ AAV Quantitation Kit (Cell Biolabs, США) согласно протоколам фирм-производителей.

Оценка экспрессии трансгена антитела в составе rAAV, трансдуцированного в клетки HEK293. Для оценки трансдуцирующей способности и экспрессии трансгена в составе rAAV проводили трансдукцию клеток HEK293 с использованием очищенного препарата rAAV. Для этого на 96-луночный планшет высевали клетки HEK293 в концентрации $0,5 \times 10^6$ клеток/мл

в среде DMEM (4 мМ глутамин, 10% FBS, бикарбонат натрия 3,8 г/л) в объеме 100 мкл. Спустя 4 ч вносили 10 мкл очищенных образцов препарата гAAV, полученных в различных условиях культивирования (концентрации сравниваемых препаратов гAAV выравняли по количеству геномных копий до наименьшей из полученных). Спустя 48 ч отбирали культуральную жидкость для дальнейшего анализа.

Культуральную жидкость оценивали с помощью электрофореза (согласно описанию в подразделе «Оценка чистоты препарата гAAV методом электрофореза») и иммуноблоттинга (согласно описанию в подразделе «Оценка подлинности препарата гAAV методом иммуноблоттинга») с использованием антител к IgG человека (Fc-специфических) (anti-human IgG, Fc-specific, peroxidase goat antibody) в соотношении 1:2500.

Результаты и обсуждение

Разработка схемы эксперимента

В настоящее время для получения гAAV методом транзientной трансфекции возможно применение нескольких подходов с использованием различных систем экспрессии. Нами была выбрана трехплазмидная система экспрессии гAAV, исходя из преимуществ, представленных в таблице 1.

В работе использовали плазмидную систему AAV-DJ, позволяющую осуществлять сборку векторного вируса гAAV, содержащего интересующий трансген, без необходимости использования вируса-помощника (аденовируса), поскольку одна из плазмид (pAAV-DJ-Helper) несет гены аденовируса, необходимые для правильной упаковки AAV. Особенностью системы AAV-DJ является экспрессия гибридного капсида, содержащего белки различных нативных серотипов: AAV-2, AAV-4, AAV-5, AAV-8, AAV-9, птичий AAV, бычий AAV и козий AAV. В результате полученный AAV-DJ является вектором с высокой способностью инфицирования клеток, который может трансдуцировать широкий спектр тканей с высокой скоростью.

Данную работу по сравнению технологических подходов к получению препарата гAAV проводили в соответствии со схемой, представленной на рисунке 1.

Для получения плазмидной scДНК использовали стандартную методику трансформации и наращивания в бактериях *E. coli*. Для очистки плазмидной scДНК использовали систему трехступенчатой хроматографической очистки с использованием Canto PlasmidSelect Xtra Starter Kit, позволяющей получать плазмидную scДНК высокой степени очистки от РНК, открытых кольцевых форм ДНК, а также остаточного количества эндотоксинов, что повышает эффективность трансфекции на следующем этапе [14].

Чистоту полученных плазмидных scДНК оценивали методом электрофоретического анализа в агарозном геле, позволяющим определить наличие РНК и различных изоформ ДНК. После этого плазмидной scДНК трансфицировали клетки HEK293 в условиях суспензионного и адгезионного культивирования, что позволяет сравнить эффективность различных подходов к культивированию.

Очистку гAAV проводили, используя аффинную хроматографию с использованием колонки с AVB сорбентом, позволяющим получать препарат гAAV высокой степени чистоты уже при одной ступени очистки. Далее проводили оценку чистоты и подлинности препарата гAAV, количества геномных копий, а также трансдуцирующей активности гAAV.

Таким образом, на первом этапе работы был разработан дизайн эксперимента, направленного на сравнение различных технологических подходов к получению гAAV в лабораторном масштабе.

Оценка получения плазмидных scДНК в препаративных количествах

Для получения плазмидной конструкции ген однодоменного антитела, слитого с Fc-фрагментом IgG1, специфического к ботулиническому нейротоксину, был субклонирован в плазмиду в pAAV-EGFP, заменив ген белка EGFP по сайтам рестрикции EcoRI и XbaI, что делает возможным получение гAAV, содержащего трансген антитела, в описанной системе.

После трансформации компетентных бактерий *E. coli* и их лизиса выделение плазмидной scДНК проводили с использованием набора PlasmidSelect Xtra Starter Kit (рис. 2) согласно

Таблица 1. Сравнение используемых систем экспрессии гAAV
 Table 1. Comparison of the rAAV expression systems

Критерии сравнения Comparison criteria	Бакуловирусовая система Baculovirus system	Система с вирусом-помощником Helper virus system	Трехплазмидная система Three-plasmid system
Масштабируемость Scalability	+++	+++	++
Эффективность доставки ДНК ^a DNA delivery efficiency ^a	+++	+++	++
Выход гAAV ^a rAAV productivity ^a	++	+	+++
Безопасность Safety	Контаминация бакуловирусом Contamination with baculovirus	Контаминация вирусом-помощником Helper virus contamination	Безопасна Safe
Преимущества Advantages	Масштабируемость, относительная безопасность Scalability, relative safety	Масштабируемость Scalability	Быстрота получения гAAV, безопасность Short period of rAAV production, safety
Недостатки Disadvantages	Низкая стабильность Low stability	Получение стабильного продуцента Development of stable producer line	Низкая масштабируемость Lack of scalability

Примечание. «+» — удовлетворительно; «+++» — хорошо; «++++» — отлично.

^a Показатели указаны согласно работе O.W. Merten [13].

Note. + satisfactory; ++ good; +++ excellent.

^a Indicators are given according to O.W. Merten [13].

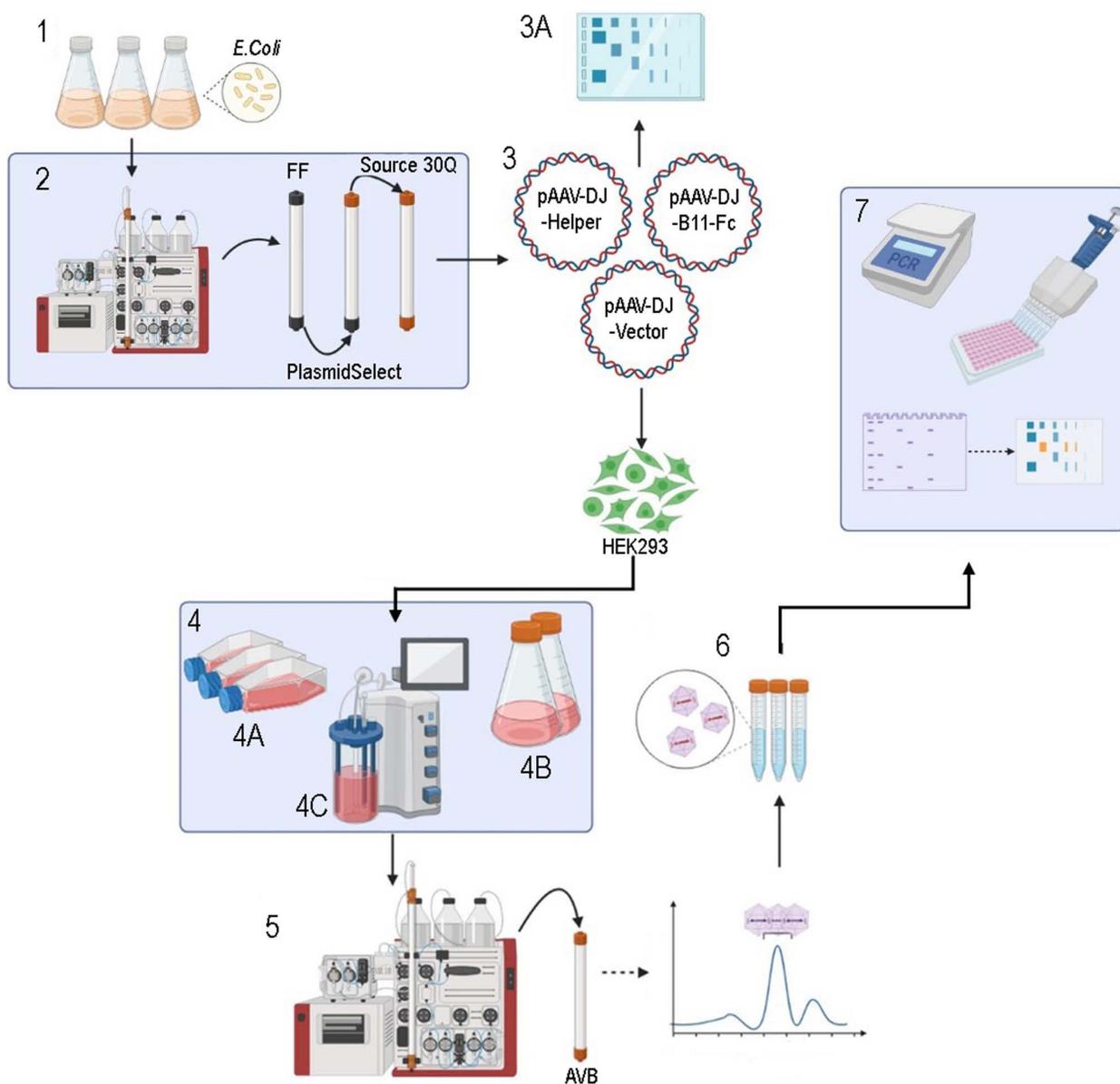


Рис. 1. Схема процесса получения очищенного препарата rAAV. 1 — наращивание плазмидной ДНК в препаративных количествах в *E. coli*. 2 — получение плазмидной scДНК при помощи системы трехступенчатой хроматографической очистки (Capto PlasmidSelect Xtra Starter Kit). 3 — scДНК, полученная с использованием системы AAV-DJ: 3А — анализ полученных плазмидных scДНК при помощи агарозного геля-электрофореза. 4 — трансфекция клеток HEK293 плазмидной scДНК с использованием трансфицирующего агента PEI: 4А — в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 в культуральных флаконах; 4В — в условиях культивирования клеток HEK293 в виде суспензии в колбах Эрленмейера; 4С — в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 в биореакторе BioBLU 5p на дисках Fibra-Cel. 5 — сбор клеточных лизатов и очистка rAAV при помощи аффинной хроматографии (AVB Sepharose). 6 — получение очищенного препарата rAAV. 7 — анализ полученного препарата rAAV при помощи методов электрофореза, иммуноблоттинга и РТ-ПЦР. Для оценки экспрессии трансгена в составе вектора на основе rAAV проводилась трансдукция клеток HEK293 и иммуноблоттинг.

Fig. 1. Scheme of the process for obtaining a purified rAAV preparation. 1—extension of plasmid DNA in preparative quantities in *E. coli*. 2—obtaining plasmid scDNA using a three-step chromatographic purification system (Capto PlasmidSelect Xtra Starter Kit). 3—scDNA obtained using the AAV-DJ system: 3A—analysis of the obtained plasmid DNA using agarose gel electrophoresis. 4—transfection of HEK293 cells with plasmid scDNA using the PEI transfecting agent: 4A—adherent culture of HEK293 cells in T-flasks; 4B—suspension culture of HEK293 cells in Erlenmeyer flasks; 4C—adherent culture of HEK293 cells in a BioBLU 5p bioreactor on Fibra-Cel disks. 5—collection of cell lysates and purification of rAAV by affinity chromatography (AVB Sepharose). 6—obtaining a purified sample of rAAV. 7—analysis of the obtained rAAV sample using electrophoresis, immunoblotting, and RT-PCR methods. Transduction of HEK293 cells and immunoblotting were performed to assess the transgene expression in the vector.

инструкции производителя. Первичную хроматографическую очистку осуществляли с использованием сорбента Sepharose 6 Fast Flow, в результате чего была получена фракция ДНК без примесей РНК. Далее проводили разделение открытой

и scДНК на сорбенте Capto PlasmidSelect Xtra. В ходе хроматографии на данной стадии процесс элюирования останавливали на 5–10 мин после снижения УФ поглощения до 5–10% от высоты пика, после чего продолжали элюирование,

что позволяло собрать более концентрированную фракцию плазмидной scДНК. На последней стадии хроматографической очистки с использованием сорбента Source 30Q проводилась очистка препарата от остаточного количества посторонних примесей и эндотоксинов. После хроматографической очистки плазмидную scДНК пересаждали ацетатом натрия для избавления от ЭДТА и других компонентов буфера, способных ингибировать процесс трансфекции.

Сложность разделения суперскрученной и открытой форм плазмидной ДНК обусловлена их близким сродством к связыванию с сорбентом [15]. Такое сходство делает

затруднительным их разделение методами стандартной анионообменной хроматографии, поэтому в данной работе была применена система Capto PlasmidSelect Xtra Starter Kit, в которой ключевым этапом является использование тииофильно-ароматической адсорбционной хроматографии на сорбенте Capto PlasmidSelect Xtra, несущем на своей матрице лиганды 2-меркаптопиридина, позволяющие за счет комплекса взаимодействий разделить данные формы. С его помощью были получены высокоочищенные фракции суперскрученной формы каждой из плазмидных ДНК, что подтверждалось электрофорезом в агарозном геле (рис. 2).

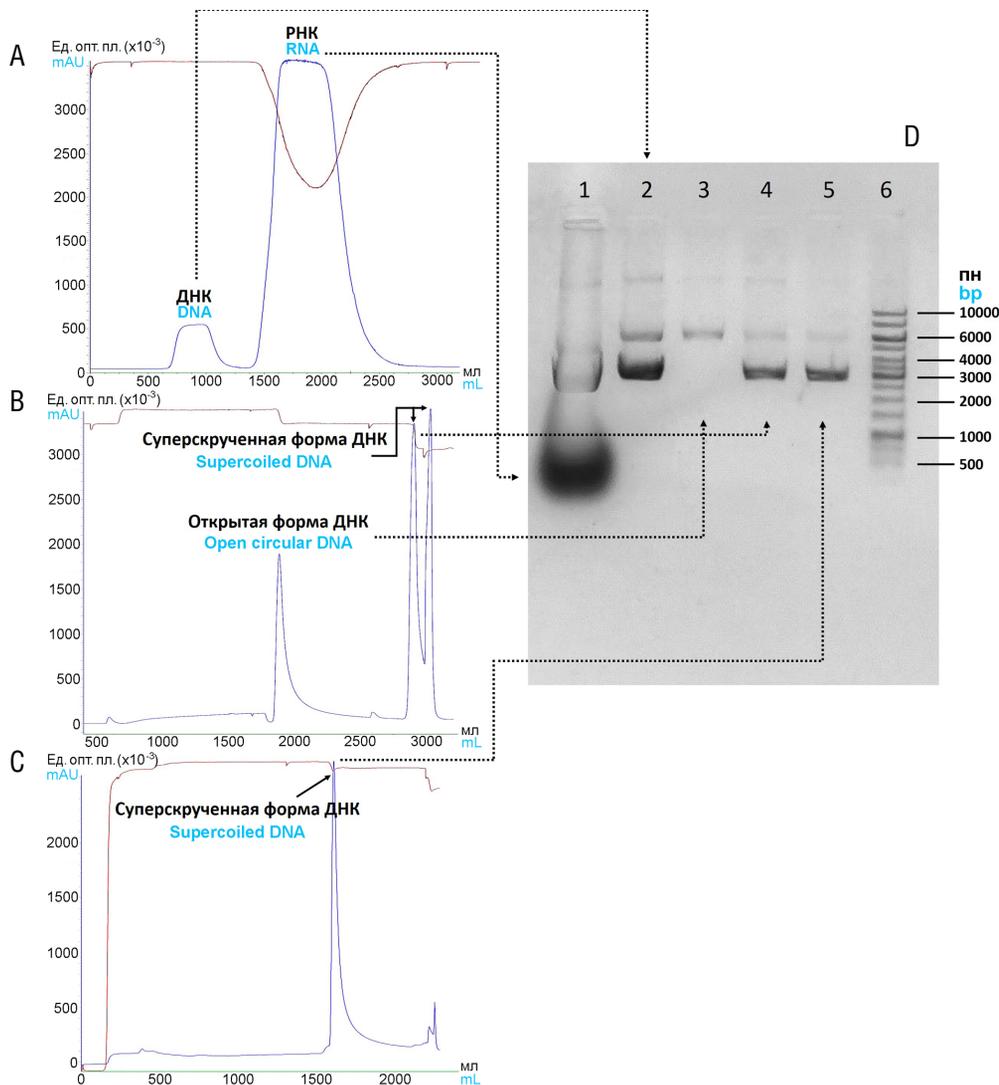


Рис. 2. Хроматограммы (А–С) и электрофореграмма (D) плазмидной ДНК на разных этапах очистки. А — аффинная хроматографическая очистка ДНК с использованием сорбента Sepharose 6 Fast Flow; на электрофореграмме D: дорожка 1 — ДНК в образце лизата трансфицированных бактерий *E. coli*, дорожка 2 — ДНК после очистки от РНК. В — аффинная хроматографическая очистка ДНК с использованием сорбента Capto PlasmidSelect Xtra; на электрофореграмме D: дорожка 3 — промывка на этапе разделения суперскрученной и открытой форм ДНК, дорожка 4 — пик фракции суперскрученной формы плазмидной ДНК. С — аффинная хроматографическая очистка ДНК с использованием сорбента Source 30Q; на электрофореграмме D: дорожка 5 — суперскрученная форма плазмидной ДНК после аффинной хроматографии с использованием сорбента Source 30Q; дорожка 6 — маркер молекулярной массы.

Fig. 2. Chromatograms (A–C) and electrophoretogram (D) of plasmid DNA at different stages of purification. A—affinity chromatography purification of DNA using the Sepharose 6 Fast Flow sorbent; electrophoretogram D: lane 1—DNA in a lysate sample of transfected *E. coli*, lane 2—DNA after purification from RNA. B—affinity chromatography purification of DNA using the Capto PlasmidSelect Xtra sorbent; electrophoretogram D: lane 3—washing at the stage of separation of supercoiled and open forms of DNA, lane 4—fraction peak of supercoiled form of plasmid DNA. C—affinity chromatography purification of DNA using the Source 30Q sorbent; electrophoretogram D: lane 5—supercoiled form of plasmid DNA after affinity chromatography using the Source 30Q sorbent; lane 6—molecular weight marker.

В результате трехстадийной хроматографической очистки были получены препараты плазмидной ссДНК, не содержащие значительных количеств примесей в виде РНК и открытой кольцевой изоформы ДНК, что показывает эффективность данного способа очистки. Возможно масштабирование процесса получения и очистки плазмидных ссДНК за счет увеличения количества трансформированных бактерий и объема используемого сорбента для хроматографии (3,2 мг плазмидной ссДНК из 1 литра ночной культуры).

Использование описанной технологии очистки плазмидной ДНК является необходимым этапом, поскольку для проведения трансфекции клеток HEK293 на следующем этапе, а также клинического применения препарата гAAV необходимым условием является наработка большого количества плазмидной ДНК в более активной — суперскрученной изоформе (более 97% в форме ссДНК), позволяющей более эффективно проводить трансфекцию клеток [16, 17]. Кроме того, в препарате ДНК не должно обнаруживаться белков клетки-хозяина и РНК; уровень геномной ДНК должен быть <2 мкг на 1 мг плазмидной ДНК; уровень содержания эндотоксинов не должен превышать 0,1 ЕЗ/мкг ДНК [15]. Использование трехстадийной хроматографической очистки обеспечивает оптимальные условия получения высокоочищенного препарата ДНК, соответствующего описанным характеристикам, в сравнении с коммерческими наборами для выделения плазмид, использующими технологию одноступенчатой анионообменной хроматографии с помощью одноразовых колонок. Преимуществом одноразовых колонок для одноступенчатой очистки является возможность выделения ДНК сразу из нескольких образцов, однако максимальная емкость таких колонок ограничена, а использование хроматографического сорбента и трехступенчатой очистки делает возможным масштабирование процесса.

Таким образом, на данном этапе работы была отработана методика получения плазмидной ссДНК, необходимой для эффективной трансфекции клеток HEK293 с целью получения препарата гAAV.

Оценка эффективности трансфекции в различных условиях культивирования клеток HEK293

В настоящее время для продукции гAAV преимущественно используют клетки в условиях адгезионного культивирования. Данный вид культивирования клеточных культур с использованием флаконов и чашек трудно масштабировать. Кроме того, при их использовании происходит увеличение времени, требуемого для манипуляций с большим количеством культуральных емкостей. Переход на суспензионные клеточные культуры

в бессывороточных условиях может позволить обеспечить значительные преимущества, заключающиеся в упрощении процесса масштабирования с точки зрения условий культивирования клеток и последующих стадий очистки вирусных векторов.

Помимо этого, можно использовать более эффективные технологии культивирования, основанные на применении адгезионной культуры клеток в биореакторе, заполненном дисками Fibracel. Диски Fibracel — матрица для роста клеток на твердой основе, состоящая из двух слоев нетканого материала — полиэстера и полипропилена, которые в процессе подготовки обрабатывают ультразвуком, разрезают и подвергают электростатической обработке для улучшения закрепления клеток на матрицу в виде дисков⁴. Одноразовые сосуды BioBLU, содержащие диски Fibracel, позволяют уменьшить число манипуляций с большим количеством колб и флаконов. Сосуд BioBLU 5p содержит 150 г дисков Fibracel⁵. Площадь поверхности адгезии одного грамма дисков Fibracel составляет 1200 см². Таким образом, использование одного сосуда BioBLU 5p обеспечивает площадь поверхности адгезии 180000 см², что эквивалентно использованию примерно 1028 флаконов⁶ (табл. 2). Однако следует отметить, что данная технология имеет недостаток, заключающийся в высокой стоимости применяемого оборудования. При всех преимуществах использование биореактора значительно затрудняет проведение подсчета клеток, ограничивая прямое проведение наблюдения за их ростом исключительно косвенными методами — по анализу метаболитов, уровню потребления питательных веществ, а также сатурации кислорода в среде.

При проведении трансфекции клеток HEK293 сравнивали три подхода культивирования клеток HEK293: культивирование клеток в виде суспензии, адгезионное культивирование клеток во флаконах и адгезионное культивирование клеток в биореакторе с дисками Fibracel. Для постановки трансфекции суспензионной культуры клеток HEK293 использовали суммарно 1 л культуральной среды BalanCD, разделенной на 5 колб Эрленмейера емкостью 1000 мл. Для проведения трансфекции адгезионной культуры клеток HEK293 использовали 30 флаконов с площадью поверхности 175 см² с общим объемом культуральной среды 1 л, а также один биореактор BioFlo с рабочим объемом 2,5 л.

Для оценки прохождения трансфекции использовали визуальную идентификацию интенсивности флуоресценции белка EGFP в клетках HEK293 в ультрафиолетовом спектре, что являлось методом косвенной оценки эффективности трансфекции (рис. 3).

Состояние клеточных культур анализировали путем подсчета числа и выживаемости клеток с использованием

Таблица 2. Сравнение площади поверхностей сосудов для адгезионного роста культур клеток⁷
Table 2. Comparison of the surface areas of vessels for adherent culture⁷

Сосуды для культивирования клеток Cell culture vessels	Общая площадь поверхности адгезии (см ²) Total adhesion surface area (cm ²)	Площадь поверхности адгезии, эквивалентная BioBLU 5p (шт) BioBLU 5p equivalent adhesion surface area (pcs)
БиоBLU 5p одноразовый сосуд BioBLU 5p single-use vessel	180 000	1
Культуральный флакон T-25 T-25 flask	25	7200
Культуральный флакон T-175 T-175 flask	175	1028
Роллерная бутылка Roller bottle	850	212

⁴ <https://bioprocessintl.com/2011/an-update-on-the-advantages-of-fibra-cel-disks-for-cell-culture-320182/>

⁵ https://www.eppendorf.com/fileadmin/General/Applications/Bioprocess_Landing_Page/Application-Note_359_BioBLU-5p.pdf

⁶ Там же.

⁷ Там же.

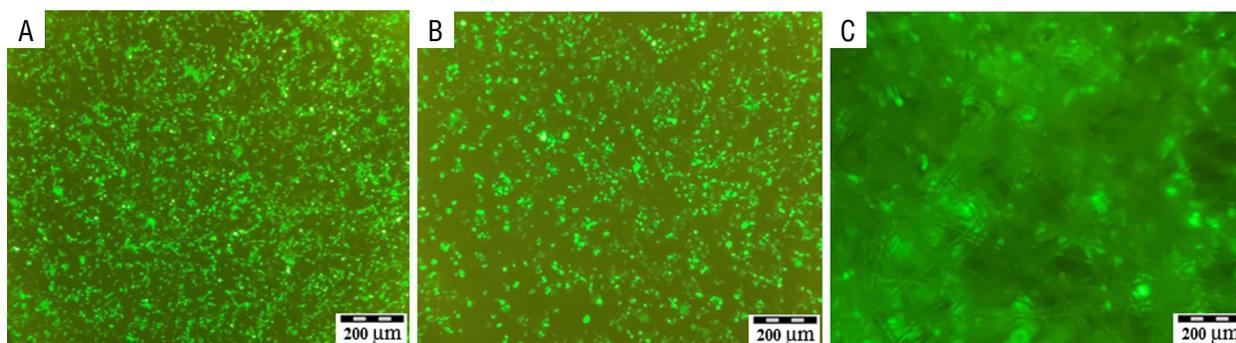


Рис. 3. Оценка эффективности трансфекции клеток HEK293 по наличию экспрессии гена белка EGFP методом флуоресцентной УФ-микроскопии: А — трансфекция клеток HEK293 в условиях адгезионного культивирования во флаконах; В — трансфекция клеток HEK293 в условиях суспензионного культивирования в колбах Эрленмейера; С — трансфекция клеток HEK293 в биореакторе BioBLU 5p. Увеличение $\times 100$.

Fig. 3. Determination of EGFP gene expression by UV fluorescence microscopy to assess HEK293 transfection efficiency: A—transfection of HEK293 cells in adherent culture in T-flasks; B—transfection of HEK293 cells in suspension culture in Erlenmeyer flasks; C—transfection of HEK293 cells in the BioBLU 5p bioreactor. Magnification 100 \times .

автоматического счетчика клеток (для суспензионной культуры клеток) и методом микроскопирования (для клеток в условиях адгезионного культивирования во флаконах). В случае клеток, культивировавшихся в условиях биореактора BioBLU 5p, отбирали пробу с целью оценки наличия мертвых клеток в культуральной среде, поскольку живые клетки закреплены на дисках Fibra-Cel адгезивно.

После культивирования в течение 72 ч проводили сбор и лизис клеток в течение 4 ч. Состав лизирующего буфера был подобран для осуществления эффективного процесса лизиса. Основным действующим веществом лизирующего раствора является детергент твин-20, нарушающий межбелковые и белково-липидные взаимодействия, что приводит к денатурации белковых структур. Входящая в состав лизирующего буфера бензонуклеаза гидролизует нуклеиновые кислоты при отсутствии протеолитической активности, что является важным при очистке вирусных структур.

Таким образом, на данном этапе была проведена трансфекция клеток линии HEK293 системой плазмидных конструкций, необходимых для сборки гААВ. По экспрессии гена белка EGFP можно сделать вывод о том, что в адгезионных условиях в культуральных флаконах, в адгезионных условиях в биореакторе BioBLU 5p и в суспензионных условиях в колбах трансфекция прошла с высокой эффективностью, что подтверждено высоким уровнем продукции зеленого флуоресцентного белка.

Получение очищенного препарата гААВ

Полученные образцы клеточных лизатов фильтровали через фильтр 0,22 мкм, концентрировали и диафильтровали, в результате чего получили по 500 мл образцов, отобранных при культивировании в условиях суспензии и адгезии (флаконы), и 1250 мл образца, отобранного из биореактора BioBLU.

Важным условием дальнейшего клинического применения препаратов на основе гААВ является эффективный способ их очистки, позволяющий получить высокий выход чистого продукта. Использование хроматографического сорбента AVB Sepharose позволяет упростить очистку, не используя промежуточный этап разделения в градиенте плотности и дальнейший комплекс очисток. Данный сорбент содержит лиганд, аффинный к гААВ, который представляет собой фрагмент однодоменного антитела, полученного из гипериммунной сыворотки в ответ на введение гААВ. Элюирование буфером с кислым рН позволяет разрушить аффинные взаимодействия и обеспечить выход чистого препарата гААВ.

В результате очистки с использованием тангенциальной фильтрации и аффинной хроматографии получали фракцию (рис. 4, пик элюции гААВ — фракции диапазона 630–640 мл) со средним объемом 10 мл для каждого из трех препаратов гААВ, полученных в различных условиях культивирования, которые были сконцентрированы до 1 мл при помощи центрифужных концентраторов 50 кДа Amicon Ultra-15.

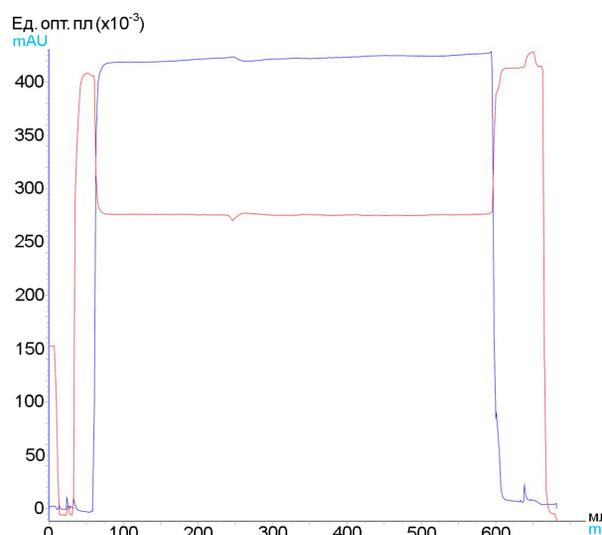


Рис. 4. Хроматограмма аффинной очистки препарата гААВ с использованием сорбента AVB Sepharose (препарат гААВ получен в условиях культивирования клеток HEK293 в виде суспензии). На графике отображены значения электропроводности (кривая красного цвета) и оптической плотности в спектре поглощения 280 нм (кривая синего цвета). Диапазон 0–60 мл — уравнивание колонки связывающим буфером, 60–600 мл — нанесение клеточного лизата на колонку, 600–630 мл — промывка связывающим буфером, 630–640 мл — пик элюции гААВ.

Fig. 4. Chromatogram of affinity purification of the rAAV sample using the AVB Sepharose sorbent (the rAAV sample was obtained from HEK293 suspension culture). The graph shows the values of electrical conductivity (red curve) and optical density at 280 nm (blue curve). The 0–60 mL range—equilibration of the column with binding buffer, 60–600 mL—addition of cell lysate to the column, 600–630 mL—washing with binding buffer, 630–640 mL—rAAV elution peak.

Несмотря на имеющиеся в литературе противоречивые данные о низкой эффективности связывания вирусных частиц AAV серотипа DJ сорбентом AVB Sepharose [18, 19], сложностей с его очисткой не возникало, что подтверждалось повторным нанесением клеточного лизата на колонку после ее регенерации. Однако с целью контроля за эффективностью очистки можно использовать методы измерения количества вирусных частиц в среде до и после очистки методами, описанными в подразделе «Оценка количества геномных копий в препаратах gAAV» раздела «Материалы и методы».

Полученные после аффинной хроматографической очистки образцы gAAV измеряли спектрофотометрически по отношению поглощения при длинах волн 260 нм/280 нм; в результате были получены следующие значения количества вирусных частиц (в относительных единицах в 1 мл (ОЕ/мл)): 0,39 ОЕ/мл — образец, полученный при культивировании клеток HEK293 в адгезионных условиях во флаконах; 0,33 ОЕ/мл — образец, полученный при культивировании в суспензионных условиях в колбах; 0,9 ОЕ/мл — образец, полученный при культивировании в адгезионных условиях на дисках Fibra-Cel; отношение 260 нм/280 нм, показывающее отношение пустых и с упакованным геномом капсидов, составило 1,15, 1,1 и 1,3 соответственно. Наибольшее количество вирусных частиц и наибольший процент капсидов с упакованным геномом были получены при культивировании на дисках Fibra-Cel. Однако данный метод количественной оценки gAAV применим только к высокоочищенным препаратам, для которых отношение 260 нм/280 нм составляет 1,48 для капсидов с упакованным геномом и 0,6 для пустых капсидов [20]. Исходя из этого, полученные препараты gAAV имеют в своем составе некоторое количество капсидов без упакованного генома, что является обычным и закономерным [21] при получении препаратов gAAV.

Таким образом, на данном этапе работы была проведена очистка препарата gAAV, полученного при использовании различных технологических подходов к культивированию клеток.

Количественная и качественная оценка полученных препаратов gAAV

Для характеристики препарата gAAV (AAV-DJ-B11-Fc) использовали различные методы анализа для изучения возможных различий в количестве, чистоте и подлинности препарата gAAV, полученного с применением трех подходов к культивированию клеток. Очищенный препарат gAAV был охарактеризован с использованием электрофореза в восстанавливающих условиях (рис. 5А). На представленной электрофореграмме присутствуют структурные белки капсида — VP1, VP2 и VP3 (1:1:10), соответствующие молекулярной массе VP белков AAV дикого типа. Было установлено, что препарат не содержит каких-либо других белков клеток-хозяина в значительных количествах.

После хроматографической очистки препарат gAAV анализировали методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител к капсидным белкам anti-VP1, anti-VP2 и anti-VP3 (рис. 5Б). Было показано, что капсидные белки VP1, VP2 и VP3 препарата gAAV специфически реагируют с антителами anti-VP1, anti-VP2 и anti-VP3, что подтверждает его подлинность.

Для приблизительного количественного определения вирусов обычно используют измерение оптической плотности. Однако этот метод нельзя назвать точным [22], так как пустые капсиды могут вносить изменения в оптическое поглощение

при 260 нм. Пустые капсиды, которые обычно образуются во время продукции gAAV, очищаются аффинной хроматографической очисткой вместе с gAAV с упакованным геномом, но избыток пустых капсидов затрудняет стандартные методики определения концентрации векторного генома по оптической плотности. Поэтому для определения геномных копий (гк) мы использовали измерение с помощью наборов QuickTiter™ AAV Quantitation Kit и AAVpro® Titration Kit методами флуоресценции и ПТ-ПЦР соответственно (табл. 3).

AAVpro® Titration Kit представляет собой набор для определения геномных копий gAAV с помощью ПЦР в реальном времени. Этот набор позволяет проводить более точную количественную оценку по сравнению с другими методами, основанную на анализе инвертированных концевых повторов (ITR) AAV2. Набор QuickTiter™ AAV Quantitation Kit дает возможность количественного определения содержания вирусных нуклеиновых кислот в препарате быстрее, чем с использованием ПЦР. Однако предел чувствительности набора составляет 1×10^9 геномных копий/мл⁸.

В результате анализа установлено, что наибольшее количество геномных копий gAAV получено в условиях культивирования в биореакторе BioBlu, которое при пересчете на 1 л оказалось сопоставимо с количеством геномных копий при культивировании в условиях адгезии во флаконах. Исходя из полученных данных определения количества геномных копий, можно сделать вывод о наличии в препарате значительного числа пустых капсидов, поскольку метод ПЦР является более точным методом определения инкапсидированной ДНК

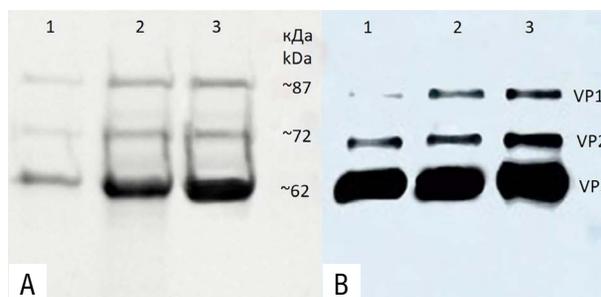


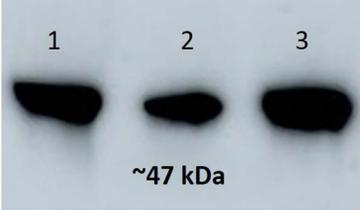
Рис. 5. Анализ чистоты и подлинности препаратов gAAV. А — электрофореграмма препаратов gAAV, полученных методом аффинной хроматографии. На электрофореграмме присутствуют структурные белки капсида gAAV — VP1 (87 кДа), VP2 (72 кДа) и VP3 (62 кДа); В — вестерн-блоттинг препаратов gAAV с использованием специфических антител к капсидным белкам anti-VP1, anti-VP2 и anti-VP3. Дорожки (на А и В): 1 — препарат gAAV, полученный в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 в колбах Эрленмейера; 2 — препарат gAAV, полученный в условиях суспензионного культивирования клеток HEK293 в колбах Эрленмейера; 3 — препарат gAAV, полученный в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 в биореакторе BioBlu на дисках Fibra-Cel.

Fig. 5. Analysis of purity and identity of rAAV preparations. A—electrophoretogram of rAAV samples obtained by affinity chromatography. The electrophoretogram shows the structural proteins of the rAAV capsid—VP1 (87 kDa), VP2 (72 kDa), and VP3 (62 kDa); B—Western blotting with specific antibodies to capsid proteins anti-VP1, anti-VP2, and anti-VP3. Lanes (A and B): 1—rAAV preparation obtained in adherent culture of HEK293 cells in T-flasks; 2—rAAV preparation obtained in suspension culture of HEK293 cells in Erlenmeyer flasks; 3—rAAV preparation obtained in adherent culture of HEK293 cells in the BioBlu bioreactor on Fibra-Cel disks.

⁸ Cellbiolabs: QuickTiter™ AAV Quantitation Kit. Product manual. <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/VPK-145-aav-quantitation-kit.pdf>

Таблица 3. Сравнение количества геномных копий векторного генома, определенных методом РТ-ПЦР и методом флуоресценции, и анализ экспрессии антител в трансдуцированных клетках

Table 3. Comparison of the numbers of genomic copies of the vector genome, determined by RT-PCR and fluorescence, and analysis of antibody expression in the transduced cells

Образец Sample	Количество геномных копий, определяемое с использованием флуоресцентного метода The number of genomic copies determined using the fluorescence method	Количество геномных копий, определяемое с использованием метода РТ-ПЦР The number of genomic copies determined using the RT-PCR method	Анализ наличия экспрессии антител в трансдуцированных клетках Analysis of the presence of antibody expression in the transduced cells
Препарат rAAV, полученный в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 во флаконах (количество геномных копий в пересчете на 1 л среды / на 1 см ² площади поверхности адгезии) rAAV preparation obtained by adherent culture of HEK293 cells in T-flasks (the number of genomic copies per 1 liter of medium/per 1 cm ² of adhesion surface area)	5,8×10 ¹³ / 1,1×10 ¹⁰	3,63×10 ¹¹ / 6,9×10 ⁷	
Препарат rAAV, полученный в условиях суспензионного культивирования клеток HEK293 в колбах Эрленмейера (количество геномных копий в пересчете на 1 л среды) rAAV preparation obtained by suspension culture of HEK293 cells in Erlenmeyer flasks (the number of genomic copies per 1 liter of medium)	3,29×10 ¹³	3,2×10 ¹¹	Вестерн-блоттинг образцов культуральной жидкости, полученных при культивировании клеток, трансдуцированных препаратом rAAV, полученным после очистки: 1 — адгезионной культуры во флаконах, 2 — суспензионной культуры в колбах Эрленмейера, 3 — адгезионной культуры в биореакторе BioBlu на дисках Fibra-Cel
Препарат rAAV, полученный в условиях адгезионного культивирования клеток HEK293 в биореакторе BioBlu на дисках Fibra-Cel (количество геномных копий в пересчете на 1 л среды / на 1 см ² площади поверхности адгезии) rAAV preparation obtained by adherent culture of HEK293 cells in the BioBLU 5p bioreactor on Fibra-Cel Disks (the number of genomic copies per 1 liter of medium/per 1 cm ² of adhesion surface area)	8,8×10 ¹³ / 1,2×10 ⁹	2,4×10 ¹² / 1,3×10 ⁷	Western-blotting of culture medium samples from cells transduced with rAAV obtained after purification of: 1—adherent culture in T-flask, 2—suspension culture in Erlenmeyer flasks, 3—adherent culture in the BioBLU 5p bioreactor on Fibra-Cel Disks

в сравнении с оценкой методом титрования с интеркалирующим красителем, неспецифично связывающимся с ДНК. Кроме того, результаты, полученные при оценке образцов спектрофотометрическим методом по отношению поглощения при длинах волн 260 нм/280 нм, описанные ранее, подтверждают данный факт. Поэтому при очистке rAAV целесообразно включать стадию дополнительной очистки, позволяющую избавиться от пустых капсидов (например, ультрацентрифугирование в йодиксаноле [23]).

Однако, исходя из данных, полученных с использованием двух методов, количество геномных копий в пересчете на 1 см² (площади поверхности адгезии) в случае культивирования на дисках Fibra-Cel было ниже, чем в случае с использованием культуральных флаконов. Это может быть связано с недостаточной эффективностью использования всей площади поверхности матрицы дисков Fibra-Cel, что требует подбора оптимальной посадочной концентрации и времени проведения трансфекции после закрепления клеток на матрице. Кроме того, на дисках Fibra-Cel невозможно

провести подсчет клеток, чтобы оценить эффективность их пролиферации.

Таким образом, наибольший выход продукта наблюдается при адгезионном культивировании трансфицированных клеток HEK293 — во флаконах и в биореакторе, наименьший — при суспензионном культивировании. Суспензионное культивирование является легко масштабируемым способом, однако выход продукта значительно ниже, чем в случае адгезионного культивирования. Недостатком способа адгезионного культивирования во флаконах является его пригодность только для получения небольших количеств препарата ввиду сложности масштабирования. Несмотря на то что метод культивирования на дисках Fibra-Cel является наиболее затратным из-за себестоимости одноразового сосуда, преимуществом метода является его удобство из-за компактности и удобства манипуляции по сравнению с культивированием в культуральных флаконах.

Для оценки трансдуцирующей способности rAAV и экспрессии трансгена проводили трансдукцию клеток HEK293 полученными в разных условиях препаратами rAAV. Для этого

все препараты выравнивали по концентрации геномных копий до наименьшего значения из полученных ($3,2 \times 10^{11}$ гк/мл по данным РТ-ПЦР с использованием AAVpro® Titration Kit) и вносили по 10 мкл в культуральную среду с клетками HEK293. Методом вестерн-блоттинга образцов культуральной среды анализировали наличие продукции однодоменных антител трансдуцированными клетками HEK293 (табл. 3). В результате проведения анализа установлено, что во всех трансдуцированных препаратом rAAV клетках происходит продукция целевых антител.

Исходя из представленных результатов можно заключить, что полученный в различных условиях препарат rAAV обладает высокой степенью чистоты, хотя и содержит пустые капсиды в небольшом количестве. Для препарата rAAV подтверждена подлинность. Препарат rAAV обладает трансдуцирующей способностью в отношении клеток HEK293, подтвержденной наличием продукции целевых однодоменных антител.

Выводы

В работе проведено сравнение технологических подходов к получению rAAV, основанных на различных методах культивирования клеточной линии HEK293 в лабораторном масштабе. Результаты исследования продемонстрировали возможность применения описанных подходов к очистке сДНК, условий трансфекции клеток, культивирования трансфицированных клеток и очистки rAAV для получения целевого препарата. Были получены следующие результаты.

1. Показана возможность применения трехступенчатой хроматографической очистки плазмидной сДНК для отделения от геномной ДНК, РНК, открытой формы плазмидной ДНК. Полученная плазмидная сДНК применима для эффективной транзientной трансфекции клеток HEK293 с целью получения rAAV.

2. Продемонстрирована возможность применения трех подходов к культивированию трансфицированных клеток HEK293 с целью продукции rAAV: суспензионное культивирование в колбах, адгезионное культивирование во флаконах и в биореакторе BioBLU 5p на дисках Fibracel. В результате анализа методами флуоресценции и РТ-ПЦР установлено, что оптимальным способом продукции rAAV в лабораторном масштабе является использование биореактора, поскольку позволяет получать высокие выходы продукта rAAV и обладает потенциалом к масштабированию, однако является ресурсоемким.

3. Анализ препарата rAAV после хроматографической очистки с использованием аффинной хроматографии подтвердил подлинность и высокую степень чистоты препарата.

4. Продемонстрирована трансдуцирующая способность препарата rAAV в отношении клеток HEK293 с последующей экспрессией трансгена, подтвержденная наличием продукции целевых однодоменных антител.

Вклад авторов. **Е. И. Рябова** — культивирование и трансфекция клеток HEK293, проведение работ, связанных с получением rAAV, интерпретация результатов исследования, сбор, анализ и систематизация информации, изложенной в научной литературе, написание текста; **А. А. Деркаев** — сбор и систематизация данных, формирование концепции статьи, сбор, анализ и систематизация информации, изложенной в научной литературе, проведение этапов количественной и качественной оценки препаратов; **И. Б. Есмагамбетов** — тангенциальная фильтрация, аффинная очистка rAAV, интерпретация полученных результатов на всех этапах работы, идея, концепция, доработка текста, утверждение окончательной версии рукописи для публикации; **Д. В. Шебляков** — дизайн генетической конструкции, экспрессирующей однодоменное антитело, сли-

тое с Fc-фрагментом; **М. А. Довгий** — получение целевой конструкции, несущей ген антитела, наработка плазмидных ДНК для сборки rAAV в препаративных количествах; **Д. В. Бырихина** — аффинная хроматография, анализ полученных хроматограмм, редактирование текста; **В. В. Прокофьев** — проведение работ, связанных с очисткой плазмидных ДНК с помощью трехступенчатой хроматографии; **И. П. Чемоданова** — проведение работ, связанных с анализом полученных плазмидных ДНК.

Authors' contributions. **Ekaterina I. Ryabova**—cultivation and transfection of HEK293 cells, obtaining of rAAV, interpretation of the study results, collection, analysis and systematisation of information presented in scientific literature, writing of the text; **Artem A. Derkaev**—collection and systematisation of data, elaboration of the concept of the paper, collection, analysis and systematisation of information presented in scientific literature, quantitative and qualitative assessment of the preparations; **Ilias B. Esmagambetov**—tangential filtration, affinity purification of rAAV, interpretation of the results obtained at all stages of the study, elaboration of the idea and concept of the paper, revision of the text, approval of the final version of the paper for publication; **Dmitry V. Shechblyakov**—elaboration of the design of the genetic construction expressing a single domain antibody; **Mikhail A. Dovgij**—obtaining the target plasmid carrying an antibody gene, production of plasmid DNA for obtaining rAAV in preparative quantities; **Daria V. Byrikhina**—affinity chromatography, analysis of the obtained chromatograms, editing of the text; **Vladimir V. Prokofiev**—purification of plasmid DNA using three-stage chromatography; **Irina P. Chemodanova**—analysis of the obtained plasmid DNA.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки. Коллектив авторов выражает благодарность ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Acknowledgements. The study was conducted without sponsorship. The team of authors express their gratitude to the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

1. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, Strohl WR. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy. *BioDrugs*. 2017;31(4):317–34. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>
2. Samulski RJ, Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic purposes. *Annu Rev Virol*. 2014;1(1):427–51. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085355>
3. Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ. Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing. *J Virol*. 2006;80(21):10346–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.00841-06>
4. Mays LE, Wang L, Lin J, Bell P, Crawford A, Wherry EJ, Wilson JM. AAV8 induces tolerance in murine muscle as a result of poor APC transduction, T cell exhaustion, and minimal MHC1 upregulation on target cells. *Mol Ther*. 2014;22(1):28–41. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.134>
5. Ahi YS, Bangari DS, Mittal SK. Adenoviral vector immunity: its implications and circumvention strategies. *Curr Gene Ther*. 2011;11(4):307–20. <https://doi.org/10.2174/156652311796150372>
6. Grieger JC, Soltys SM, Samulski RJ. Production of recombinant adeno-associated virus vectors using suspension HEK293 cells and continuous harvest of vector from the culture media for GMP FIX and

- FLT1 clinical vector. *Mol Ther.* 2016;24(2):287–97. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.187>
7. Rajendra Y, Kiseljak D, Baldi L, Wurm FM, Hacker DL. Transcriptional and post-transcriptional limitations of high-yielding, PEI-mediated transient transfection with CHO and HEK-293E cells. *Biotechnol Prog.* 2015;31(2):541–9. <https://doi.org/10.1002/btpr.2064>
 8. Wright JF. Transient transfection methods for clinical adeno-associated viral vector production. *Hum Gene Ther.* 2009;20(7):698–706. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.064>
 9. Keeler AM, Flotte TR. Recombinant adeno-associated virus gene therapy in light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where are we, and how did we get here? *Annu Rev Virol.* 2019;6(1):601–21. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015530>
 10. Godakova SA, Noskov AN, Vinogradova ID, Ugriumova GA, Solovyev AI, Esmagambetov IB, et al. Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice. *Toxins (Basel).* 2019;11(8):464. <https://doi.org/10.3390/toxins11080464>
 11. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp.* 2007;6:253. <https://doi.org/10.3791/253>
 12. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979;7(6):1513–23. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>
 13. Merten OW. AAV vector production: state of the art developments and remaining challenges. *Cell Gene Therapy Insights.* 2016;2(5):521–51.
 14. Sousa F, Prazeres DMF, Queiroz JA. Improvement of transfection efficiency by using supercoiled plasmid DNA purified with arginine affinity chromatography. *J Gene Med.* 2009;11(1):79–88. <https://doi.org/10.1002/jgm.1272>
 15. Diogo MM, Queiroz JA, Prazeres DMF. Chromatography of plasmid DNA. *J Chromatogr A.* 2005;1069(1):3–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.09.050>
 16. Stadler J, Lemmens R, Nyhammar T. Plasmid DNA purification. *J Gene Med.* 2004;6(Suppl 1):S54–S66. <https://doi.org/10.1002/jgm.512>
 17. Cupillard L, Juillard V, Latour S, Colombet G, Cachet N, Richard S, et al. Impact of plasmid supercoiling on the efficacy of a rabies DNA vaccine to protect cats. *Vaccine.* 2005;23(16):1910–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.10.018>
 18. Zhao H, Lee KJ, Daris M, Lin Y, Wolfe T, Sheng J, et al. Creation of a high-yield AAV vector production platform in suspension cells using a design of experiment approach. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020;18:312–20. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.06.004>
 19. Nass SA, Mattingly MA, Woodcock DA, Burnham BL, Ardinger JA, Osmond SE, et al. Universal method for the purification of recombinant AAV vectors of differing serotypes. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;9:33–46. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.12.004>
 20. Sommer JM, Smith PH, Parthasarathy S, Isaacs J, Vijay S, Kieran J, et al. Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement. *Mol Ther.* 2003;7(1):122–8. [https://doi.org/10.1016/s1525-0016\(02\)00019-9](https://doi.org/10.1016/s1525-0016(02)00019-9)
 21. Benskey MJ, Sandoval IM, Manfredsson FP. Continuous Collection of Adeno-Associated Virus from Producer Cell Medium Significantly Increases Total Viral Yield. *Hum Gene Ther Methods.* 2016;27(1):32–45. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2015.117>
 22. Hajba L, Guttman A. Recent Advances in the Analysis Full/Empty Capsid Ratio and Genome Integrity of Adeno-associated Virus (AAV) Gene Delivery Vectors. *Curr Mol Med.* 2020;20(10):806–13. <https://doi.org/10.2174/1566524020999200730181042>
 23. Crosson SM, Dib P, Smith KJ, Zolotukhin S. Helper-free production of laboratory grade AAV and purification by iodixanol density gradient centrifugation. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018;10:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.05.001>

Об авторах / Authors

Рябова Екатерина Игоревна. Ekaterina I. Ryabova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>

Деркаев Артем Алексеевич. Artem A. Derkaev. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3776-3856>

Есмагамбетов Ильяс Булатович, канд. биол. наук. Ilias B. Esmagambetov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Щебляков Дмитрий Викторович, канд. биол. наук. Dmitry V. Shcheblyakov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

Довгий Михаил Андреевич. Mikhail A. Dovgiy. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0017-7784>

Бырихина Дарья Валерьевна. Daria V. Byrikhina. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3971-5823>

Прокофьев Владимир Владимирович. Vladimir V. Prokofiev. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>

Чемоданова Ирина Петровна. Irina P. Chemodanova. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4525-0364>

Поступила 06.07.2021

После доработки 05.11.2021

Принята к публикации 10.12.2021

Received 6 July 2021

Revised 5 November 2021

Accepted 10 December 2021